

90° und einer Ionenstärke von 0,1 herangezogen werden. Die Auflösung des Hitzekoagulats beruht im Falle dieses BJP auf einer Kompensation der intermolekularen Bindungskräfte im Koagulat durch die thermische Energie der Moleküle. Diese Erklärung der Hitzelöslichkeit ließ vermuten, daß die Auflösung von Hitzefällungen bei Temperaturen über 90° nicht auf BJP beschränkt ist, sondern allgemein bei Proteinen beobachtet werden kann und lediglich in Abhängigkeit von Molekülgröße und -struktur bei mehr oder minder hohen Temperaturen eintritt. Die Versuche mit Ovalbumin und die Untersuchungen von PUTNAM bestätigen dies. Da Ovalbumin

und viele andere Proteine zwar in der Hitze löslich sind, jedoch meist nicht dissoziieren, ist die Dissoziation der BJP zur Erklärung der Hitzelöslichkeit nicht eine notwendige Voraussetzung.

Die leichte „Renaturierbarkeit“ des BJP-R ist einer näheren Untersuchung wert. Es hat sich gezeigt, daß das durch Hitze oder durch extreme pH-Werte denaturierte BJP-R anscheinend seine ursprüngliche Molekülform annimmt, wenn es langsam in die Nähe des isoelektrischen Punktes gebracht wird oder bei diesem pH-Wert länger stehengelassen wird.

### Literatur

1. EDELMAN, G. M. und J. A. GALLY, J. Exper. Med. 116, 207 (1962). — 2. PUTNAM, F. W. und P. STELBS, J. biol. Chemistry 203, 347 (1953). — 3. CAPUTO, A., Oncologia 12, 203 (1959). — 4. HEIMER, R., E. R. SCHWARTZ, R. L. ENGLE und K. R. WOODS, Biochemistry 2, 1380 (1963). — 5. PUTNAM, F. W., C. W. EASLEY, L. T. LYNN, A. E. RITCHIE und R. A. PHELPS, Arch. Biochem. Biophysics 83, 115 (1959). — 6. HOLASEK, A., I. PASCHER und H. HAUSER, Mh. Chem. 92, 463 (1961). — 7. SØRENSEN, S. P. L. und M. HØYRUP, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 103, 15 (1918). — 8. DIERMATR, E. und A. HOLASEK, Microchem. J. (New York)

10, 231 (1966). — 9. KUNITZ, M., J. Gen. Physiol. 32, 241 (1949). — 10. EISENBERG, M. A. und G. W. SCHWERT, J. Gen. Physiol. 34, 583 (1950). — 11. CASEY, E. J. und K. I. LAIDLOR, J. Amer. chem. Soc. 73, 1455 (1951). — 12. EYRING, H. I., J. chem. Physics 3, 107 (1935). — 13. STEARN, A. E., Advances in Enzymol. 9, 25 (1945). — 14. SCATCHARD, S. in Cohn Edsall, Proteins Amino Acids and Peptides, S. 445, 473—75, Reinhold Publ. Corp., New York (1943). — 15. BERNIER, G. M. und F. W. PUTNAM, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 86, 295 (1964).

Professor Dr. A. Holasek  
Physiolog.-chem. Institut der Universität  
Graz (Österreich) Universitätsplatz 2

## Der Einfluß von Serumfraktionen auf die Fettsäuresynthese

### II. Mitteilung: Arbeitsweise für in-vitro-Untersuchungen mit dem löslichen Enzymsystem der Hühnerleber<sup>1)</sup>

VON D. EBERHAGEN UND W. SEITZ

Technische Mitarbeit B. WITTMANN

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Seitz)

(Eingegangen am 28. Februar 1966)

Es wird eine vereinfachte Arbeitsweise zur Gewinnung des extramitochondrialen, fettsäuresynthetisierenden Hühnerleberenzymsystems als stabiles Trockenpräparat und zur Bestimmung seiner Aktivität beschrieben. Auf diese Weise wurden die mit Hilfe der präparativen trägerfreien Elektrophorese gewonnenen Fraktionen eines Normalserums und eines Diabetikerserums auf ihre Beeinflussung des Enzymsystems hin untersucht. Es fanden sich eine den <sup>14</sup>C-Einbau aus Acetat in langkettige Fettsäuren fördernde und mehrere hemmende Fraktionen. Die Ergebnisse wurden mit Versuchen verglichen, die mit dem entsprechenden Enzymsystem der Taubenleber durchgeführt wurden.

A simplified method is reported for isolating and determining the activity of a stable dry preparation of the extramitochondrial, fatty acid-synthetising chicken liver enzyme system. Fractions obtained by preparative carrier-free electrophoresis from normal and diabetic serum were tested for their influence on the enzyme system. The incorporation of <sup>14</sup>C-acetate into long chain fatty acids was stimulated by one fraction and inhibited by several others. The results are compared with those obtained with the corresponding enzyme system from pigeon liver.

In einer vorausgehenden Arbeit (1) war über die in-vitro-Beeinflussung des langkettigen Fettsäuren aus Acetat de novo synthetisierenden extramitochondrialen Enzymsystems der Taubenleber durch verschiedene elektrophoretisch gewonnene Blutserumfraktionen berichtet worden. Bei diesen Untersuchungen hatte sich im Serum gesunder Personen eine nichtdialysierbare, im elektrischen Feld rasch anodenwärts wandernde Substanz

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

gefunden, die eine ausgeprägte stimulierende Wirkung auf die Fettsäuresynthese besaß und wahrscheinlich phosphorhaltig war. Weiterhin ließen sich zwei Fraktionen mit einer Hemmwirkung auf den <sup>14</sup>C-Einbau in die langkettigen Fettsäuren nachweisen. Ihre elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten lagen zwischen denen der Präalbumine und der Albumine. In den Seren von Diabetikern wurde zusätzlich noch eine Fraktion ermittelt, die im elektrischen Feld noch stärker als die synthesefördernde Substanz abgelenkt wurde und

die den stärksten bisher von uns in diesem Zusammenhang beobachteten Hemmeffekt auf unser Inkubationssystem zeigte. Im folgenden möchten wir nun über entsprechende Versuche mit dem extramitochondrialen Enzymsystem der *Hühnerleber* berichten. Es sollte dabei geprüft werden, ob dieses System in gleicher Weise wie das der Taubenleber beeinflusst wird oder ob die erzielten Effekte nur mit den Taubenleberenzymen möglich sind.

Da die bisher von uns angewandte Arbeitsweise relativ zeitraubend und umständlich und unter den gegebenen Voraussetzungen zur Untersuchung einer großen Probenzahl nicht geeignet war, haben wir uns um die Entwicklung einer vereinfachten Methodik bemüht. Es ging uns dabei neben der Ausschaltung zeit- und arbeitsaufwendiger Einzelschritte im Analysengang insbesondere auch um eine technisch unkomplizierte Durchführung, damit die Bestimmung auch von nicht speziell ausgebildeten Hilfskräften vorgenommen werden konnte. Die Vorteile der Verwendung eines Enzymtrockenpulvers sind bereits an anderer Stelle (1) diskutiert worden. Durch Vereinigung aller notwendigen Cofaktoren in einer Lösung und Zugabe dieses Gemisches zu den Einzelansätzen konnte eine erhebliche Reduzierung der Pipettiervorgänge erreicht werden. Außerdem wurde die Inkubation in der *Warburg*-Apparatur zugunsten der Inkubation in handelsüblichen Reagenzgläsern verlassen. Diese Umstellung brachte zugleich eine Erhöhung der Einbaurate um etwa ein Drittel. Schließlich wurde die Inkubationsdauer von 3 Stunden auf 1 Stunde reduziert. Die Verseifung der Lipide erfolgte anschließend in den gleichen Röhrchen, aus denen dann aliquote Teile zur Extraktion der durch Säurezusatz freigesetzten Fettsäuren entnommen wurden. Bei der Gewinnung der Fettsäuren durch Verteilung der Verseifungsansätze gegen Petroläther wurde zur Homogenisation des Phasensystems ein Rotationsmischer verwendet. Es genügte ein Verteilungsschritt, um praktisch die gesamte extrahierbare Radioaktivität zu erfassen. Die Zugabe der Reagenzien geschah im allgemeinen mit Hilfe von Pipettierautomaten. Die Vollständigkeit des Verseifungs- und Extraktionsschrittes wurde durch Kontrollversuche sichergestellt (Tab. 2, 3). Auf ein Eindampfen des petrolätherischen Fettsäureextraktes konnte bei der Aktivitätsbestimmung mit dem Scintillationszählverfahren verzichtet werden, da die Petrolätherzugabe keinen wesentlichen Einfluß auf die Zählausbeute hatte, andererseits aber beim Verdampfen des Lösungsmittels ein Teil der Radioaktivität — infolge der Flüchtigkeit der Fettsäuren mit 14 und weniger Kohlenstoffatomen — verloren ging. Der mittlere Fehler der Einzelbestimmung (prozentuale Standardabweichung) betrug bei der Durchführung des gesamten Arbeitsganges  $\pm 5\%$ .

Wie die Abbildung 1a erkennen läßt, zeigten die mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese nach HANNIG (2) gewonnenen Fraktionen eines Diabetikerserums in beiden Enzymsystemen grundsätzlich die gleiche Wirkung auf die Höhe der Syntheserate. In den Gläsern mit den am stärksten im elektrischen Feld abgelenkten Serumbe-

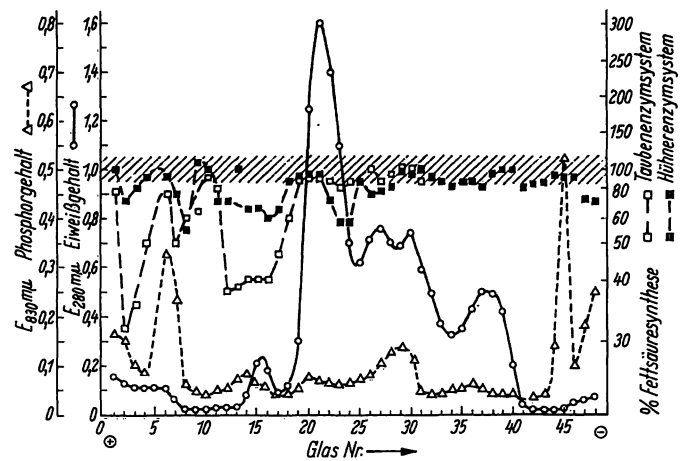


Abb. 1 a

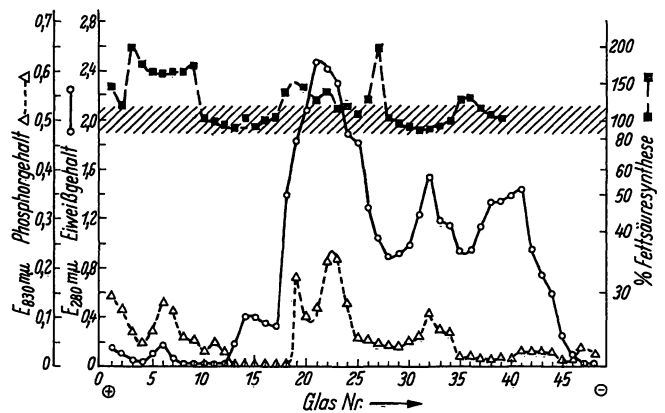


Abb. 1 b

Die Beeinflussung der cytoplasmatischen Fettsäuresynthese in der Hühner- (■ --- ■) und Taubenleber (□ --- □) — ausgedrückt als  $^{14}\text{C}$ -Einbau aus markiertem Acetat in die langkettigen Fettsäuren — durch die elektrophoretisch aufgetrennten Serumfraktionen eines Diabetikers (Abb. 1a) und eines Stoffwechselgesunden (Abb. 1b). Die Ordinate ist linear in Vielfachen der unbeeinflussten Syntheserate aufgetragen, der 100%-Bereich durch Schrägschraffierung hervorgehoben. Der Eiweißgehalt der Fraktionen (○—○) ist als Extinktion bei 280 m $\mu$  angegeben, der Phosphorgehalt (Δ --- Δ) als Extinktion der nach Veraschung der Substanzen gebildeten Phosphormolybdänsäure bei 830 m $\mu$ . Die Seren sind in Höhe des Auffangglases Nr. 38 in die Trennkammer eingeführt

standteilen fand sich — wie früher — eine ausgeprägte Hemmung, die sich in den folgenden Röhrchen mit zunehmendem Phosphorgehalt der Fraktionen verringerte. Daran anschließend verstärkte sich die Synthesehemmung wieder. Dieser Kurvenverlauf läßt sich vielleicht durch Überlagerung zweier Effekte deuten, indem in einem relativ breiten Bereich der Hemmung als schmales Band die durch ihren Phosphorgehalt ausgewiesene Fördersubstanz eingelagert ist. Im Präalbumingebiet konnten wieder die auch in den früheren Versuchen gefundenen beiden Hemmfraktionen nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der mit beiden Enzymsystemen erzielten Einbauraten ergibt eine geringere Beeinflussbarkeit beim Hühnerlebersystem. Das mag durch eine bessere Komplettierung mit Cofaktoren bedingt sein. Es kann andererseits aber auch artspezifische Ursachen haben, zumal

Tab. 1

<sup>14</sup>C-Einbau aus Acetat in die langkettigen Fettsäuren durch das Hühnerleberenzymssystem in Abhängigkeit vom Cofaktoren-Zusatz.  
Inkubationsbedingungen siehe Text

Mn-Cl <sub>2</sub> μMol	MgCl <sub>2</sub> μMol	ATP μMol	NADPH μMol	NADH μMol	CoA μMol	Na-Citrat μMol	Zählausbeute Ipm
2,5	—	40	0,23	0,2	0,02	50	3380
—	1	40	0,23	0,2	0,02	50	90
2,5	1	40	0,23	0,2	0,02	50	3250
2,5	—	40	0,23	—	0,02	50	1870

Tab. 2

Abhängigkeit der Zählausbeute von den Verseifungsbedingungen

Verseifung mit	Radioaktivität des Extraktes (Ipm)
0,5 m/ gesättigte äthanol. NaOH	16580
1,0 m/ gesättigte äthanol. NaOH	30460
0,5 m/ 5-proz. äthanol. NaOH	19210
1,0 m/ 5-proz. äthanol. NaOH	29800
0,5 m/ 5-proz. methanol. NaOH	7330
1,0 m/ 5-proz. methanol. NaOH	11330
0,5 m/ 30-proz. wäßr. NaOH	110
1,0 m/ 30-proz. wäßr. NaOH	90

Tab. 3

Abhängigkeit der Zählausbeute von der Extraktionstechnik.  
Einzelheiten über die Zusammensetzung des Phasensystems s. Text

Extraktionstechnik	Radioaktivität des Extraktes (Ipm)
0,5 Min. Homogenisation des Phasenge- mischtes im Rotationsmischer	20450
1,0 Min. Homogenisation des Phasenge- mischtes im Rotationsmischer	19800
Rotation im Rotationsmischer bis zur Homogenisation der Phasen	20500
Erneute Homogenisation der unteren Phase des obigen Versuches mit frischer oberer Phase	320

beide Systeme sich hinsichtlich ihres Bedarfes an Mn-Ionen prinzipiell unterscheiden. Das Taubenlebersystem kann sowohl durch Mg- als auch durch Mn-Ionen aktiviert werden. Demgegenüber setzt — wie Tabelle 1 zeigt — das Hühnerlebersystem bei Abwesenheit von Mn-Ionen kein Acetat zu langkettigen Fettsäuren um. Es besteht in diesem Fall also ein absoluter Bedarf an Mn-Ionen. Auch im elektrophoretischen Verhalten ihrer Eiweißkörper ergaben sich gewisse Unterschiede. Schließlich muß in diesem Zusammenhang die Frage diskutiert werden, welchen Einfluß die Ernährung auf die Ausbildung der Leberenzyme hat. Die Schlachthühner werden unter künstlichen Lebensverhältnissen mit einer speziellen Kost ausschließlich unter dem Gesichtspunkt eines raschen Fleischansatzes aufgezogen, während die verwendeten Tauben unter weitgehender Annäherung an die natürlichen Umweltsbedingungen aufgewachsen waren.

Bei der Untersuchung der Serumfraktionen einer stoffwechselgesunden Person auf ihre Beeinflussung des Hühnerlebersystems fand sich erwartungsgemäß auch hier die synthesesfördernde Komponente mit rascher elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit (Abb. 1b). Entsprechend dem relativ geringen Phosphorgehalt der betreffenden Fraktionen waren die Effekte allerdings nicht sehr groß. Bei der Ermittlung des Cofaktorenbedarfes hatte sich eine Erhöhung der Syntheserate bei Anwesenheit von NADH ergeben. Eine NADH-bedingte Aktivierung des Hühnerleberenzymsystems hatte auch TIERZ (3) beschrieben. Die Bedeutung dieser Tatsache ist nicht klar, da an keiner der bekannten, zur Bildung der langkettigen Fettsäuren führenden Einzelreaktionen dieses Coenzym beteiligt ist (4—6).

Nach diesen Ergebnissen ist das Hühnerlebersystem als Testsystem durchaus brauchbar. Es war ursprünglich wegen seiner Stabilität gegenüber dem Einfrieren und Wiederauftauen (3) in Betracht gezogen worden, so daß es sich auch zur Herstellung eines Trockenpulverpräparates durch Lyophilisierung eignen mußte. Außerdem wurde seine Aktivität im Vergleich zu Säugetierlebersystemen als hoch angegeben (7). Das bisher verwendete Taubenlebersystem war wegen der starken jahreszeitlichen Aktivitätsschwankungen und wegen gewisser Schwierigkeiten bei der Beschaffung größerer Mengen für die Durchführung umfangreicher Untersuchungsreihen auf die Dauer nur bedingt geeignet.

## Methodik

### Reagenzien

Na-1-<sup>14</sup>C-Acetat wurde von der Fa. New England Nuclear Corp., Boston, USA geliefert. — CoA, NADPH, NADH und ATP wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim, die anderen Chemikalien von der Fa. E. Merck, Darmstadt bezogen.

### Herstellung des Enzymtrockenpulvers

Für die Versuche kamen ausschließlich schlachtfrische Hühnerlebern mit makroskopisch einwandfreier Beschaffenheit zur Verwendung, die aus einer Geflügelschlachtereie bezogen wurden. Die bis zur — möglichst anschließend vorgenommenen — Verarbeitung eiskühlten Organe wurden mit einem Messerhomogenisator (Fa. E. Bühler, Tübingen) unter Zusatz der 1,5fachen Menge Kaliumphosphat-bicarbonatpuffer (pH 7,4) zerkleinert. Zur Entfernung der größeren Teilchen wurde der Gewebepulver zuerst 15 Min. bei  $36 \times 10^3$  g (Ultrazentrifuge Modell L2 der Fa. Beckman, München, Rotor 19,  $15 \times 10^3$  U./Min.) zentrifugiert. Die Sedimentation der subzellulären Partikel erfolgte anschließend durch 75 Min. langes Zentrifugieren des Überstandes bei etwa  $8 \times 10^4$  g (Rotor 30,  $3 \times 10^4$  U./Min.). Die auf der Flüssigkeitsoberfläche abgesetzte Fettschicht wurde sorgfältig entfernt und der Überstand gefrierge-

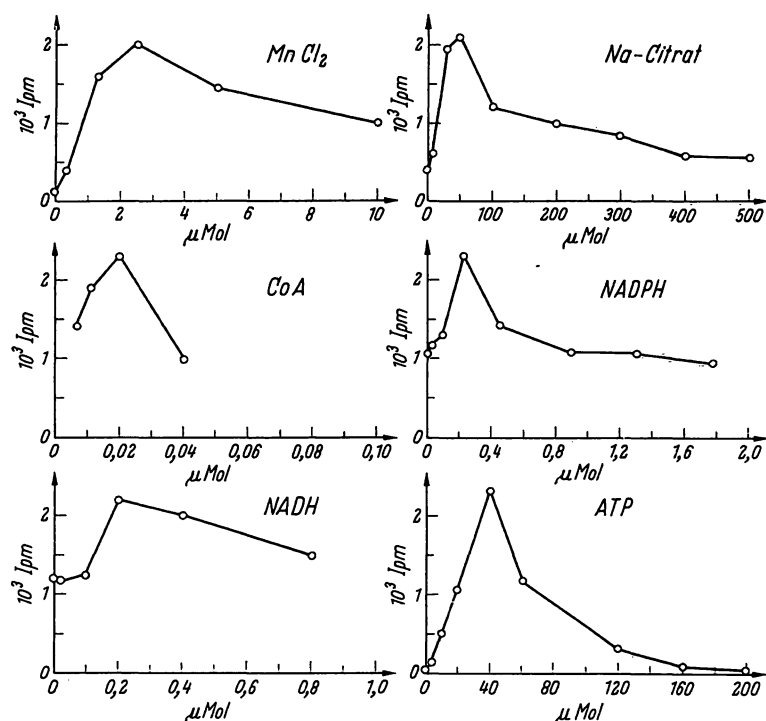


Abb. 2  
Cofaktorbedarf des fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems  
der Hühnerleber als Trockenpulver

Es wurde jeweils die Abhängigkeit des <sup>14</sup>C-Acetateinbaus in die langkettigen Fettsäuren von den verschiedenen zur Komplettierung der Ansätze verwendeten Substanzen dargestellt. Die anderen Cofaktoren lagen dabei in den im Text angegebenen Konzentrationen vor

trocknet. Alle Arbeitsgänge wurden bei 0–5° durchgeführt. Das derart gewonnene Trockenpulver wurde über Calciumchlorid bei +3° aufbewahrt. Nach 3 Monate langer Lagerung unter diesen Bedingungen konnte keine Verringerung der Enzymaktivität festgestellt werden.

#### Inkubation

Es wurde 1 Std. lang in normalen Reagenzgläsern (15×160 mm) bei 37° inkubiert. Jeder Ansatz enthielt neben der auf ihre Wirksamkeit zu testenden Serumfraktion 0,1 g Trockenpulver des Enzymsystems, 2,5 μMol MnCl<sub>2</sub>, 50 μMol Na-Citrat, 0,02 μMol Coenzym A, 0,23 μMol NADPH, 0,2 μMol NADH, 40 μMol ATP und 1 mg <sup>14</sup>C-Acetat als Na-Salz (etwa 5×10<sup>4</sup> Ipm bei Messung mit einem Endfensterzählrohr FHZ 15a der Fa. Friscke & Hoepfner, Erlangen-Bruck). Wie die Abbildung 2 zeigt, wurden unter diesen Bedingungen während der Inkubation optimale Einbausraten des Acetats in langkettige Fettsäuren erzielt. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 3,0 ml. Bei der praktischen Durchführung wurden Lösungen folgender Konzentrationen verwendet:

In aqua bidest.: MnCl<sub>2</sub> 0,5-proz.; Na-Citrat 17,85-proz.; CoA 0,015-proz.;

in 1-proz. Bicarbonatlösung: NADPH 0,25-proz.; NADH 0,17-proz.; ATP 12,1-proz.

Für eine Versuchsreihe mit 12 Gläsern wurden hiervon jeweils 1,3 ml — mit Ausnahme der ATP-Lösung — vereinigt; von letzterer wurde die doppelte Menge verwendet. Jeweils 0,7 ml dieses Gemisches wurden in jedes der eisgekühlten Reagenzgläser eingefüllt. Dann löste man 1,3 g Trockenpulver in 13,0 ml aqua bidest. auf und pipettierte 1,0 ml in die Röhrchen. Schließlich wurden die 4 mg Biuret-Eiweiß entsprechenden Mengen der Serumfraktionen zugesetzt, die Volumina mit aqua bidest. auf 2,9 ml gebracht und mit 0,1 ml der <sup>14</sup>C-Acetatlösung das markierte Substrat zugegeben. Unmittelbar darauf wurden die Gläser durch Auflegen einer Glaskugel verschlossen und in den Thermostaten gestellt.

#### Extraktion der Fettsäuren

Nach Beendigung der Inkubation wurden zu jedem der Ansätze 5 ml gesättigte äthanolische Natronlauge gegeben und diese 1 Std. lang auf 60° erwärmt. Als Doppelversuch wurden dann 1,0 ml des Reaktionsgemisches in ein Zentrifugenröhrchen (17×96 mm) gegeben, die Lösung durch Zusatz von 0,5 ml 18-proz. Salzsäure angesäuert, 2,0 ml Petroläther (Kp. 50–70°) zugegeben und der Röhrcheninhalt mit Hilfe eines Rotationsmischers („Whirlmix“ der Fa. Cenco Instrumenten, Breda, Niederlande) homogenisiert. Zur Trennung der Phasen wurde dann 10 Min. lang bei 3,5×10<sup>3</sup>g und 0–3° zentrifugiert (Kühlzentrifuge der Fa. Christ, Osterode/Harz). Dabei waren die Gläser mit Kunststoffhauben verschlossen worden, um Lösungsmittelverluste zu vermeiden, die eine mangelhafte Reproduzierbarkeit der Bestimmung zur Folge haben. Die Zentrifugation hatte sich deswegen als notwendig erwiesen, weil in der petrolätherischen Phase enthaltene Wasserspuren zu einer Verringerung der Zählausbeute führten. 0,5 ml der oberen Phase wurden entweder zu 5 ml Scintillatormischung (5 g PPO und 0,3 g Dimethyl-POPOP in 1000 ml Toluol) gegeben und die Aktivität im „Tricarb“-Scintillationszählgerät oder, wie früher beschrieben (1), auf Kupferplättchen aufgetragen und mit einem Methandurchflußzählrohr gemessen.

#### Auftrennung der Seren

Sie geschah mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese wie bei (1) angegeben. Der Eiweißgehalt in den einzelnen Serumfraktionen wurde nach WEICHSELBAUM (8), der Phosphorgehalt durch Veraschen von 0,2 ml Serumfraktion nach BARTLETT (9) bestimmt.

Frl. C. STIEHLER sind wir wieder für ihre sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen ebenso wie Frl. cand. med. H. KÜPPERS zu großem Dank verpflichtet.

#### Literatur

- SEITZ, W. und D. EBERHAGEN, diese Z. 4, 22 (1966).
- HANNIG, K., Z. analyt. Chem. 181, 244 (1961).
- TIETZ, A., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 25, 303 (1957).
- WAITE, M. und S. J. WAKIL, J. biol. Chemistry 238, 77, 81 (1963).
- HSU, R. Y., G. WASSON und J. W. PORTER, J. biol. Chemistry 240, 3736 (1965).
- SCHWEIZER, E., D. OESTERHELT, W. CHAN, CH. DUBA und F. LYNEN, 16. Mosbacher Colloquium, 28.—30. April 1965, im Druck.
- WAKIL, S. J., J. Lipid Res. 2, 1 (1961).
- WEICHSELBAUM, T. E., Amer. J. Clin. Path. 10, 49 (1946).
- BARTLETT, G. R., J. biol. Chemistry 243, 466 (1959).

Professor Dr. W. Seitz  
Med. Universitäts-Poliklinik  
8 München 15  
Pettenkofer Str. 8a